动 物 学 研 究 2004, Apr. 25 (2): 158 ~ 161
Zoological Research

CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853

黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 的克隆、组织表达谱及在性别逆转前后性腺中的表达

刘绪生，梁 冰，张树义*
（中国科学院动物研究所，北京 100080）

摘要：利用 RT-PCR 和 3′-RACE 的方法从黑鲷精巢中克隆了 *DMRT*1 基因 cDNA 的部分序列。组织特异性表达分析表明 *DMRT*1 基因只在精巢中表达。半定量 RT-PCR 检测显示 *DMRT*1 基因在性别逆转前、性别逆转期和性别逆转后的精巢中的表达量无显著差异。在鱼类成体的精巢中，*DMRT*1 的表达量可能不会因精巢结构或生理状态的改变而发生改变，而始终维持一定量的表达。

关键词：黑鲷；*DMRT*1 基因；表达；精巢
中图分类号：Q959.4 **文献标识码**：A **文章编号**：0254 - 5853(2004)02 - 0158 - 04

cDNA Cloning, Tissue Distribution and mRNA Transcription of *DMRT*1 Gene in the Protandrous Black Porgy *Acanthopagrus schlegeli*

LIU Xu-sheng, LIANG Bing, ZHANG Shu-yi*
(*Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract: Using RT-PCR and 3′-RACE, *DMRT*1 gene was partially cloned from the black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. RT-PCR showed that *DMRT*1 mRNA was only expressed in the testis. When the transcript levels of *DMRT*1 were measured in the testis of black porgy before sex change, during sex change, or after sex change, no significant changes in the gene expression were observed. The results show that the transcript levels of *DMRT*1 gene in the testis of black porgy don't vary according to the changes of physiological status and structure of the testis.

Key words: Black porgy; *Acanthopagrus schlegeli*; *DMRT*1; Expression; Testis

*DMRT*1 是一种目前已知最保守的性别分化相关基因，编码的蛋白质都包含一个具有 DNA 结合能力的保守基序，即 DM（doublesex and mab-3）结构域；在性别分化期的雄性性腺及雄性成体的性腺中表达，与雄性性腺的分化和形成有关（Raymond et al, 1998; Grandi et al, 2000; Brunner et al, 2001）。

黑鲷为雌雄同体雄性先熟鱼类。同一个体中存在精巢和卵巢两种组织，中间以结缔组织相间隔。在第一和第二个繁殖季节，精巢内精子发生并成熟，以雄性的形式参与繁殖；第二次繁殖结束后，黑鲷开始性别逆转，精巢组织退化，卵巢组织渐渐发育成功能性卵巢，因而在第三个繁殖季节以雌性的形式参与繁殖。黑鲷性别逆转完成后，精巢组织退化为残迹形式，精原细胞消失，失去了生成精子的能力（Chang & Yueh, 1990; Lee et al, 2001）。因此，性别逆转前后黑鲷精巢组织在生理状态和结构上都有很大差异。鉴于其他研究者揭示的 *DMRT*1 基因在鱼

收稿日期：2003 - 09 - 25；接受日期：2003 - 12 - 12
基金项目：中国科学院知识创新工程创新项目（KSCX 3 - IOZ - 03）及其重要创新方向项目（KSCX2 - 1 - 03）；国家自然科学基金项目（30025007, 30270169）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail：zhangsy@a-1.net.cn

类中的功能，我们推测 *DMRT*1 基因可能与黑鲷性别逆转有关，其表达量会随着性别逆转而发生变化。基于这种推测，我们克隆了黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 的部分序列，分析了该基因在不同组织中的分布，并通过半定量 RT-PCR 检测了 *DMRT*1 基因在性别逆转前、性别逆转期和性别逆转后的精巢组织中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料和 RNA 的提取

在浙江沿海黑鲷的繁殖期为 3～5 月。繁殖结束后的第 3 个月是黑鲷 2 龄鱼性别逆转的关键时期（Lee at al，2002），因此本研究于 2002 年 8 月取样。人工养殖黑鲷样品来自浙江舟山半岛海水养殖公司，其个体发育比较一致。采集 1、2 和 5 龄分别代表性别逆转前、性别逆转期和性别逆转后，样本量分别为 5、9 和 5 条，平均体重分别为 113.6±16.4、310.2±21.5 和 914.0±87.2 g。黑鲷捕捞上岸后，立即解剖取出精巢等各种组织，剪成小块后加入适量的 RNALater 溶液（Ambion 公司产品），运回实验室后保存于 -70 ℃冰箱待用。用 Trizol 试剂（Invitrogen 公司产品）提取总 RNA。

1.2 黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 部分序列的克隆

以精巢总 RNA（1 μg）为模板，利用 SuperScript Ⅱ 反转录酶（Invitrogen 公司产品）合成 cDNA 第一链。根据已发表的鱼类 *DMRT*1 基因 DM 结构域保守序列，设计一对简并引物，上游引物：5′-TGCCCAAGTGCTC（TC）CG（CG）TG（TC）（AC）GGA-3′，下游引物：5′-CCTG（GAC）GCCGCCAT（GA）ACTCT-3′。以 cDNA 第一链为模板，用此对引物进行 PCR。50 μL 反应体系中含：2 μL 第一链 cDNA 产物，5 μL 10×PCR buffer，1.5 mmol/L $MgCl_2$ 溶液，0.2 mmol/L dNTPs 溶液，上下游引物各 0.8 μmol/L，2.5 U Taq DNA 聚合酶（大连 TaKaRa 公司）。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，59 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，循环 35 次；72 ℃延伸 10 min。

根据获得的 cDNA 片段序列，设计特异性引物：5′-ATGTAAGCTGATAGCGGAGAGGCAGA-3′，用于 3′RACE。用 SMART RACE cDNA Amplification Kit（Clonetech 公司产品）进行 RACE，具体操作按该公司的产品说明书进行。

1.3 DNA 序列测定和序列分析

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收和 DNA 凝胶回收试剂盒纯化后，克隆于 pUCm-T 载体（上海生工产品）上，再将重组体克隆转化到感受态大肠杆菌中，通过蓝、白斑筛选，将阳性克隆进行扩大培养，纯化重组质粒 DNA。以 M13 引物在 Megbase 1000 测序仪（Amersham Pharmacia 公司）上测序（RT-PCR 测 3 个克隆，3′-RACE 测 5 个克隆）。将测得的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列，用 BLAST 软件进行同源性分析。

1.4 半定量 RT-PCR

各种组织及不同鱼龄的精巢组织均取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。取 1 μL cDNA 产物进行 PCR。PCR 引物为根据已知黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 序列设计的一对引物，上游引物：5′-GCCCAAGTGCTCTCGGTGTA-3′，下游引物：5′-AAGGACGCTGCCATGGTCTCA-3′。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，循环 30 次；72 ℃延伸 10 min。根据黑鲷 β-actin 基因序列（未发表）设计一对引物，上游引物：5′-GAGAAGCTGTGCTATGTCGC-3′，下游引物：5′-TAAGTCCCCAGATGCAAC-3′。利用该引物进行 PCR 作为内源参照物。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，54 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，循环 26 次；72 ℃延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物电泳，EB 染色，数码凝胶成像系统拍照。用 Gel-Pro 4.0 凝胶图像分析软件（Media Cybernetics，USA）对 RT-PCR 条带进行光密度扫描定量。以 *DMRT*1 与 β-actin 的比值表示 *DMRT*1 基因 mRNA 的转录水平。

2 结果与分析

2.1 黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 部分序列的克隆结果及同源性分析

通过 RT-PCR 和 3′-RACE，获得的 cDNA 序列总长度为 830 bp，含终止子 TAA，推导出 275 个氨基酸残基（图 1）。同源性分析表明，所获得的黑鲷 *DMRT*1 基因氨基酸序列与其他鱼类 *DMRT*1 基因相应序列的同源性较高，如与罗非鱼的同源性为 80%，与青鳉的同源性为 66%，与虹鳟的同源性为 58%。

2.2 组织特异性表达

通过 RT-PCR 检测了 *DMRT*1 基因在黑鲷大脑、心脏、肝、肌肉、肠、肾脏、精巢和卵巢等 8 种组

织中的表达情况（图 2）：*DMRT*1 基因只在精巢中表达，在其他 7 种组织中则未检测到 *DMRT*1 基因的表达。将 PCR 循环数增加到 35 后，在这 7 种组织中仍则未检测到 *DMRT*1 基因的表达。

2.3 *DMRT*1 基因在性别逆转前后黑鲷精巢组织中的表达水平

通过半定量 RT-PCR 检测了 *DMRT*1 基因在 1、2 和 5 龄黑鲷精巢组织中的表达情况。Duncan 检验表明，*DMRT*1 基因在这 3 个年龄段精巢组织中的表达量无显著差异。

3 讨 论

同其他鱼类 *DMRT*1 基因 cDNA 的全长序列相比，我们获得的黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 序列缺少了 5′端约 80 bp 左右的序列。虽然我们设计了多条引物进行 5′-RACE，但均未成功，可能是 5′-RACE 技术在本研究中的局限性所致。

在我们即将完成本项研究时，其他研究者在

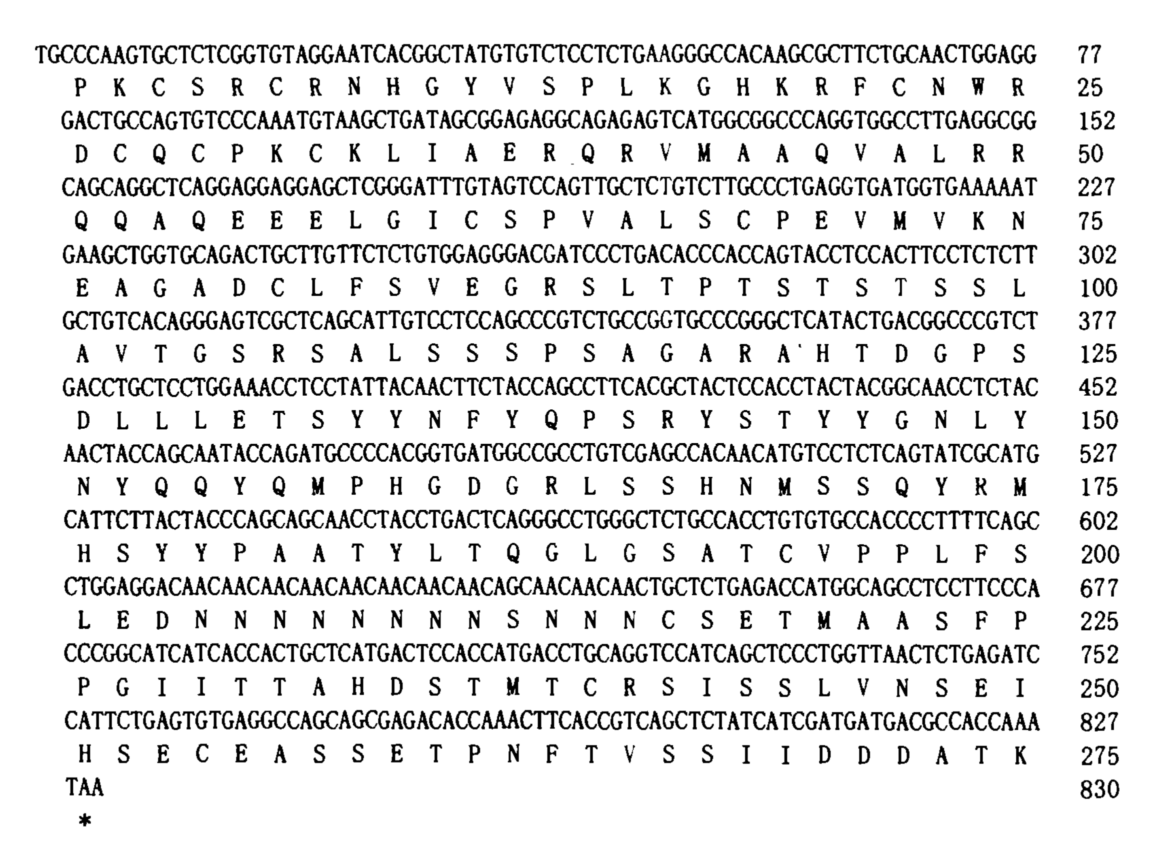


图 1 黑鲷 *DMRT*1 基因 cDNA 片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Partial cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *DMRT*1 in *Acanthopagrus schlegeli*

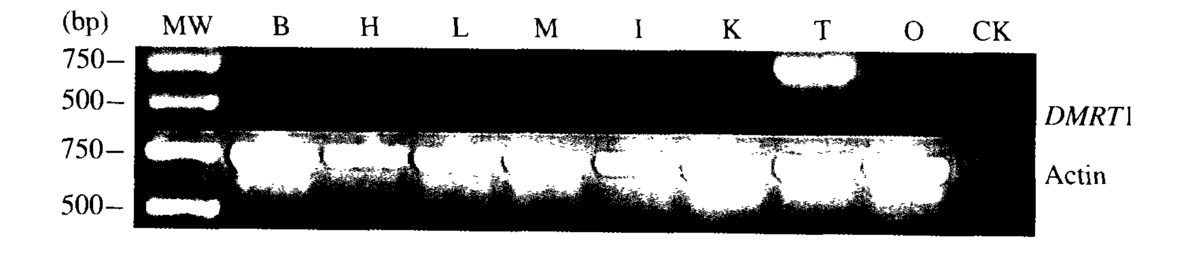


图 2 黑鲷 *DMRT*1 基因在 8 种组织中的表达

Fig.2 Tissue specific expression of *DMRT*1 transcript in various tissues of adult *Acanthopagrus schlegeli*

MW：分子量标准（Molecular weight）；B：大脑（Brain）；H：心脏（Heart）；L：肝（Liver）；M：肌肉（Muscle）；I：肠（Intestine）；K：肾脏（Kidney）；T：精巢（Testis）；O：卵巢（Ovary）；CK：阴性对照（Negative control）。

GenBank 上公布了黑鲷 *DMRT*1 基因的全长序列（登录号：AY323953）。我们获得的序列与他们获得的序列的相应部分在长度上一致，但在碱基水平上有 12 个位点的差异，在蛋白质水平上有两个位点的差异。这可能是不同地方种群间的多态性造成的。如能补充其他地方的黑鲷样品测序，将有可能解释这一差异。

经性腺组织学检查，1 龄（性别逆转前）、2 龄（性别逆转期）和 5 龄（性别逆转后）黑鲷的精巢组织无论在结构还是生理状态上都有很大的差异，但 *DMRT*1 基因的转录水平却没有显著的差异。这与虹鳟精子发生前后 *DMRT*1 基因在精巢中的转录水平未发现显著差异（Marchand et al，2000）的结果相同。因此我们推测，在鱼类成体精巢中，*DMRT*1 的表达量可能始终维持一定量，不会因精巢结构和生理状态的改变而改变。

参考文献：

Brunner B, Hornung U, Shan Z, Nanda I, Kondo M, Zend-Ajusch E, Haaf T, Ropers HH, Shima A, Schmid M, Kalscheuer VM, Schartl M. 2001. Genomic organization and expression of the Doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT*1 [J]. *Genomics*, **77** (1-2): 8-17.

Chang CF, Yueh WS. 1990. Annual cycle of gonadal histology and steroid profiles in the juvenile males and adult females of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* [J]. *Aquaculture*, **91** (1-2): 179-196.

Grandi AD, Calvari V, Bertini V, Bulfone A, Peverali G, Camerino G, Borsani G, Guioli S. 2000. The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation [J]. *Mechanisms of Development*, **90** (2): 323-326.

Lee YH, Du JL, Yueh WS, Lin BY, Huang JD, Lee CY, Lee MF, Lau EL, Lee FY, Morrey C, Nagahama Y, Chang CF. 2001. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: A review in gonadal development, estradiol estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin [J]. *Journal of Experimental Zoology*, **290** (7): 715-726.

Lee YH, Yueh WS, Du JL, Sun LT, Chang CF. 2002. Aromatase inhibitors block natural sex change and induced male function in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker: Possible mechanism of natural sex change [J]. *Biology of Reproduction*, **66** (6): 1749-1754.

Marchand O, Gororoun M, D'Cotta H, McMeel O, Lareyre JJ, Bernot A, Laudet V, Guiguen Y. 2000. *DMRT*1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorchynchus mykiss* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1493** (1-2): 180-187.

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes [J]. *Nature*, **391** (6668): 691-695.